

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

UNTERSUCHUNG ZUR
AKTIVITÄTSVERTEILUNG PARAOXON
SPALTENDER SERUMENZYME
BEI FINNEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Alfred Koller
aus Neumarkt/Opf.

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

UNTERSUCHUNG ZUR AKTIVITÄTSVERTEILUNG PARAOXON SPALTENDER SERUMENZYME BEI FINNEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Alfred Koller
aus Neumarkt/Opf.

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. V. Becker

Referent: Prof. Dr.Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt

Korreferent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling

Tag der mündlichen Prüfung: 07.02.1983

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. <u>EINLEITUNG</u>	1
1. Struktur und Bedeutung der Organophosphate	1
2. Wirkungsweise von Parathion	2
3. Metabolismus	2
4. Paraoxonase: Historische Entwicklung und genetische Aspekte	4
5. Besondere Stellung der Paraoxonase unter den Serumenzymen	11
II. <u>PROBLEMSTELLUNG</u>	13
III. <u>RASSISCHE EINORDNUNG DER FINNEN</u>	15
IV. <u>EIGENE UNTERSUCHUNGEN</u>	17
1. Probanden	17
2. Gewinnung, Aufbewahrung und Transport der Serumproben	17
3. Messung der Aktivität	19
4. Ergebnisse	23
V. <u>STATISTISCHE AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE</u>	30
1. Das Kollektiv der frisch abgenommenen Seren	30
2. Das Kollektiv der 20 Monate alten Seren	32
VI. <u>DISKUSSION</u>	35
VII. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	39
VIII. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	40



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546217_0072

I. EINLEITUNG

1) Struktur und Bedeutung der Organophosphate

Organophosphate sind seit geraumer Zeit bekannt und finden heute ausgeprägte Anwendung als Insektizide zum Schutz von Ernten. Außerdem werden Organophosphate als hochtoxische Kampfgifte (z.B. TABUN) hergestellt, sowie in der Augenheilkunde (z.B. MINTACOL, E 600) verwendet. Sie lassen in der von Gerhard Schrader angegebenen Formel eine gemeinsame chemische Struktur erkennen (Abb. 1).

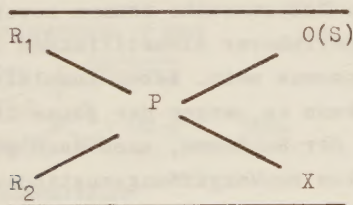


Abb. 1: Struktur der Organophosphate

R_1, R_2 = Alkyl- oder Aminogruppe

X = Acylrest

Bei Parathion (E 605; 0,0-Diäthyl-0-p-nitrophenylthiophosphat) handelt es sich um die bekannteste, weltweit Verwendung findende Substanz dieser Art. Die Bedeutung dieser Verbindung liegt nicht allein

in ihrer Verwendung als Insektizid, sondern zeigt sich auch in toxikologischer Hinsicht. Akzidentelle, suizidale, auch homozidale Intoxikationen waren und sind nicht selten.

2) Wirkungsweise von Parathion

Die Giftwirkung von Parathion beruht auf der Blockierung der Acetylcholinesterase, sowie weiterer Cholinesterasen. Es kommt zur Anhäufung von Acetylcholin. Die Symptome sind demnach nikotinerger und muskarinerger Art. Klinische Vergiftungserscheinungen treten bei einer Serum-Cholinesterasehemmung von etwa 75 % ein. Todesursache können sowohl zentraler und peripherer Atemstillstand wie auch ein Bronchospasmus sein. Neben Inhalation und Ingestion kann es, wegen der guten Lipoidlöslichkeit der Substanz, auch nach perkutaner Applikation zu Vergiftungszuständen kommen.

3) Metabolismus

Parathion, selbst eigentlich ungiftig, wird erst nach der Aufnahme durch den Warmblüterorganismus in einer Giftungsreaktion in den stark toxischen Metaboliten Paraoxon (0,0-Diäthyl-0-p-nitrophenylphosphat) umgewandelt. Dies geschieht in Anwesenheit von Sauerstoff und NADPH durch sogenannte mischfunktionelle Oxidasen wohl zum größten Teil in der Leber. Außer Paraoxon entstehen noch weitere

Metaboliten, wie Abb. 2 zeigt (NEAL, 1971).

Stoffwechsel von PARATHION im Warmblüter

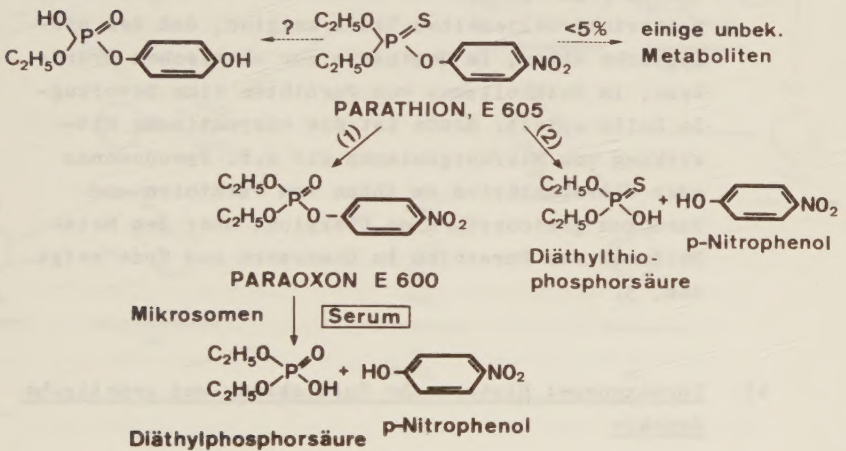


Abb. 2: Metabolismus von Parathion bei Warmblütern

SETHUNATHAN et al. (1978) befaßten sich mit dem Abbau von Parathion und Paraoxon im Wasser und der Erde. Sie berichten, daß Parathion wahrscheinlich eine der widerstandsfähigsten Substanzen gegenüber chemischem Abbau unter den Organophosphaten darstellt. Trotzdem besitzen Parathion und mehr noch Paraoxon kürzere Halbwertszeiten als andere Organophosphate. Studien mit sterilen und bakteriell besiedelten Erden zeigten, daß der biologische Abbau, im Gegensatz zur chemischen Hydrolyse, im Metabolismus von Parathion eine bevorzugte Rolle spielt. Heute ist die enzymatische Mitwirkung von Mikroorganismen wie z.B. *Pseudomonas* oder Flavobakterien am Abbau von Parathion und Paraoxon gesichert. Eine Übersicht über den Metabolismus von Parathion in Gewässern und Erde zeigt Abb. 3.

4) Paraoxonase: Historische Entwicklung und genetische Aspekte

MAZUR (1946) beschrieb erstmals ein Enzym in tierischem Gewebe, das fähig wäre, die Säure-Anhydrid Bindung von Anticholinesterasen zu spalten. Später gelangten andere Untersucher zu der Einsicht, daß spezifische Enzyme (Phosphorylesterasen) an der Entgiftung von Cholinesterasehemmern in verschiedenen Organen beteiligt sind.

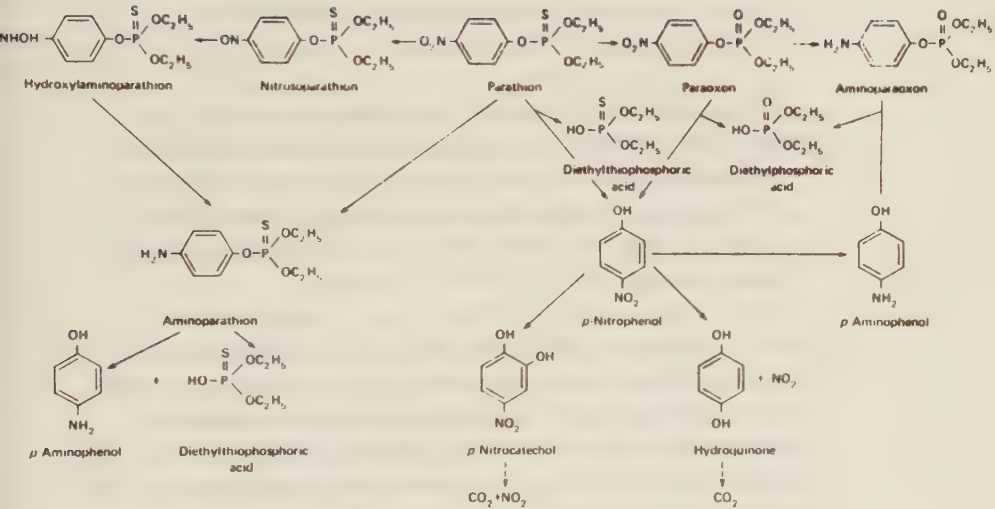


Abb. 3: Metabolismus von Parathion im Wasser und der Erde; nach SETHUNATHAN (1978)

Der erste, der im Serum von Warmblütern das Vorhandensein von Esterasen, die p-Nitrophenylacetat, -propionat und -butyrat, spalten, beschrieb, war ALDRIGE (1953). Jene Esterase, die imstande war auch Parathion zu hydrolysieren, nannte er A-Esterase (aromatische Esterase).

Der Begriff "Paraoxonase" erschien gerechtfertigt, seit MAIN (1960) fand, daß dieses Enzym aus gereinigtem Schafserum zwar Paraoxon, nicht jedoch Phenylacetat hydrolytisch abbaut. Daß zahlreiche Tierarten eine solche Paraoxonase besitzen, war seit den Untersuchungen von ALDRIGE bekannt.

Auch ZECH und ZÜRCHER (1973) untersuchten menschliches Serum, sowie Serum und Ratten, Schafen, Hasen usw. enzymkinetisch und fanden dabei verschieden hohe Maximalaktivitäten von Phosphorylphosphatase bei diesen Säugetieren. Sie zeigten außerdem, daß der Abbau von Paraoxon zu p-Nitrophenylphosphat bei allen diesen Tieren nach der Art einer Michaelis-Kinetik verläuft.

So viel über den Abbau von Paraoxon heute bekannt ist, so wenig weiß man gegenwärtig noch über die molekulare Struktur der Paraoxonase. Das Molekulargewicht wird auf etwa 500.000 geschätzt (ZECH und ZÜRCHER, 1973). Eine Charakterisierung des Enzyms findet sich bei KRISCH (1968).

In der Arbeit von KRISCH wird zudem über eine Hemmbarkeit der menschlichen Serumparaoxonase durch EDTA (Äthylen-diamin-tetra-Essigsäure) berichtet. Schon ERDÖS (1961) wußte um die weitgehende Hemmbarkeit der Serumparaoxonase durch 0,01 m EDTA-Lösung. Er fand auch, daß in menschlichen Seren eine weitere Paraoxon spaltende Proteinfraction vorhanden ist, welche gegen EDTA unempfindlich ist, jedoch durch Aurintricarbonsäure gehemmt wird. Beide Hemmstoffe bewirkten eine völlige Inaktivierung der Paraoxonase.

SKRINJARIC und SPOLJAR (1968) und Mitarbeiter untersuchten, wie zuvor schon ERDÖS, die menschlichen Cohn-Fractionen IV - I und V und bestätigten die bereits vorhandene Annahme, wonach zwei verschiedene Enzyme für die Hydrolyse von Paraoxon verantwortlich seien. Die teilweise Hemmbarkeit der Paraoxonase durch den Chelatbildner EDTA ließ an eine Calcium-Abhängigkeit dieses Enzymanteils denken.

HECHTEL (1980) zeigte, daß die Zugabe von Ca^{++} einer späteren Hemmung der Paraoxonase durch EDTA vorbeugen kann.

Die Annahme einer Existenz von zwei eigenständigen "Paraoxonasen", eines Ca^{++} - abhängigen (durch EDTA hemmbaren) und eines Ca^{++} - unabhängigen (durch EDTA nicht hemmbaren) Enzyms, erscheint

heute gerechtfertigt. Sie wird bekräftigt durch die Tatsache, daß durch EDTA ungehemmte Paraoxonaseaktivitäten stets völlig andere Verteilungsmuster ergaben als sie durch EDTA gehemmte Paraoxonaseaktivitäten erhalten werden.

Da in der vorliegenden Untersuchung das Ca^{++} -abhängige und das Ca^{++} -unabhängige Enzym stets gemeinsam in die Messungen eingingen, stehen die im Text auftretenden Ausdrücke "Paraoxonase" und "Paraoxonaseaktivität" immer für die Gesamtheit der Paraoxon spaltenden Enzyme im Serum.

GELDMACHER - v. MALLINCKRODT et al. (1969) befaßten sich mit der unterschiedlichen Hemmung menschlicher Serumcholinesterase durch Paraoxon. Bei in-vitro-Vergiftungen menschlicher Seren mit Paraoxon fanden sich unterschiedlich hohe verbleibende Cholinesteraseaktivitäten. Graphisch dargestellt ergab sich eine dreigipflige Verteilung, von niedrigen, mittleren und hohen Restcholinesteraseaktivitäten.

Bei Bestimmung der Paraoxonaseaktivität nach KRISCH (1968) und der Messung der Cholinesteraserestaktivität (Anti-Che-Methode) im Serum der gleichen Probanden konnte ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,86$ gefunden werden (GELDMACHER - v. MALLINCKRODT et al. 1972).

Eine Verteilung, wie sie für die Paraoxonaseaktivitäten von 180 Westdeutschen gefunden wurde, zeigt Abb. 4.

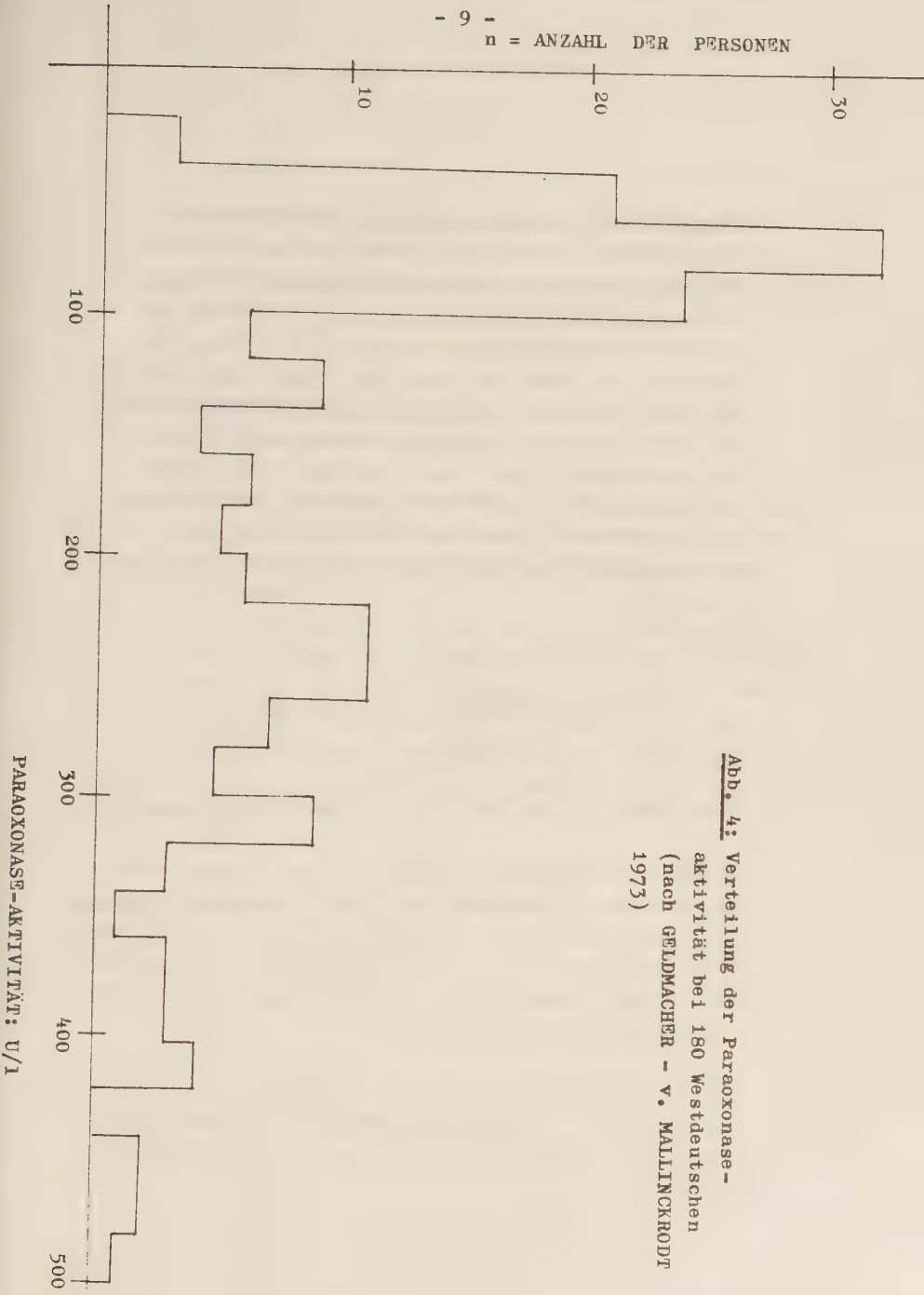


Abb. 4: Verteilung der Paraoxonase-
aktivität bei 180 Westdeutschen
(nach GELDMACHER - v. MALLINCKRODT
1973)

GELDMACHER - v. MALLINCKRODT et al. (1979) zeigten, daß bei der Inkubation von 799 Seren westdeutscher, nicht verwandter Personen mit Paraoxon Cholinesterase-Restaktivitäten von 0 bis 67,4 % verblieben. Man fand erneut eine Verteilung, die niedrige, mittlere und hohe Aktivitäten unterscheiden ließ. In dieser Publikation wiesen die Autoren auf die Gültigkeit der Hardy Weinberg-Formel für die ermittelten drei Phänotypen hin. Als Genfrequenzen p und q nannte sie $p = 0,7595$ und demnach $q = 0,2405$. Die prozentualen Häufigkeiten der verschiedenen Phänotypen gliederten sich folgendermaßen auf:

Niedrige Aktivitäten	57,9 %
Mittlere Aktivitäten	36,1 %
Hohe Aktivitäten	6,0 %

Diese Werte gelten für ein 95 % Konfidenz-Intervall.

Familienuntersuchungen führten zu der Vorstellung, daß die drei Phänotypen von einem dominanten Erbgang nach dem 2-Allele-Modell gesteuert werden. Diese Aussage galt zunächst für die deutsche Bevölkerung. Für die gesamte europäische Bevölkerung muß dieser Tatbestand noch überprüft werden.

PLAYFER (1976) bestätigte diese Vorstellungen über das Vorliegen verschiedener Phänotypen durch Messungen der Paraoxonase-Aktivität bei englischen Kollektiven.

Eine ebenfalls nichteuropäische Verteilung der Serumparaoxonaseaktivität fand OMURO (1980) für 512 Japaner. Abb. 5 zeigt diese Aktivitätsverteilung.

5) Besondere Stellung der Paraoxonase unter den Serumenzymen

Welche Bedeutung Serumenzyme heute in der klinisch-chemischen Diagnostik erlangt haben, ist bekannt. Die Wertigkeit des Serumenzyms Paraoxonase kann gegenwärtig noch nicht voll eingeschätzt werden. Es erscheint jedoch allein deshalb von Interesse, weil es erstens kein natürliches Substrat (PLAYFER 1976) besitzt und zweitens eine polymorphe Verteilung aufweist. Damit steht es im Gegensatz zu vielen bekannten Serumenzymen, deren Aktivität geringe Streubreiten, jedenfalls bei Gesunden, besitzt.

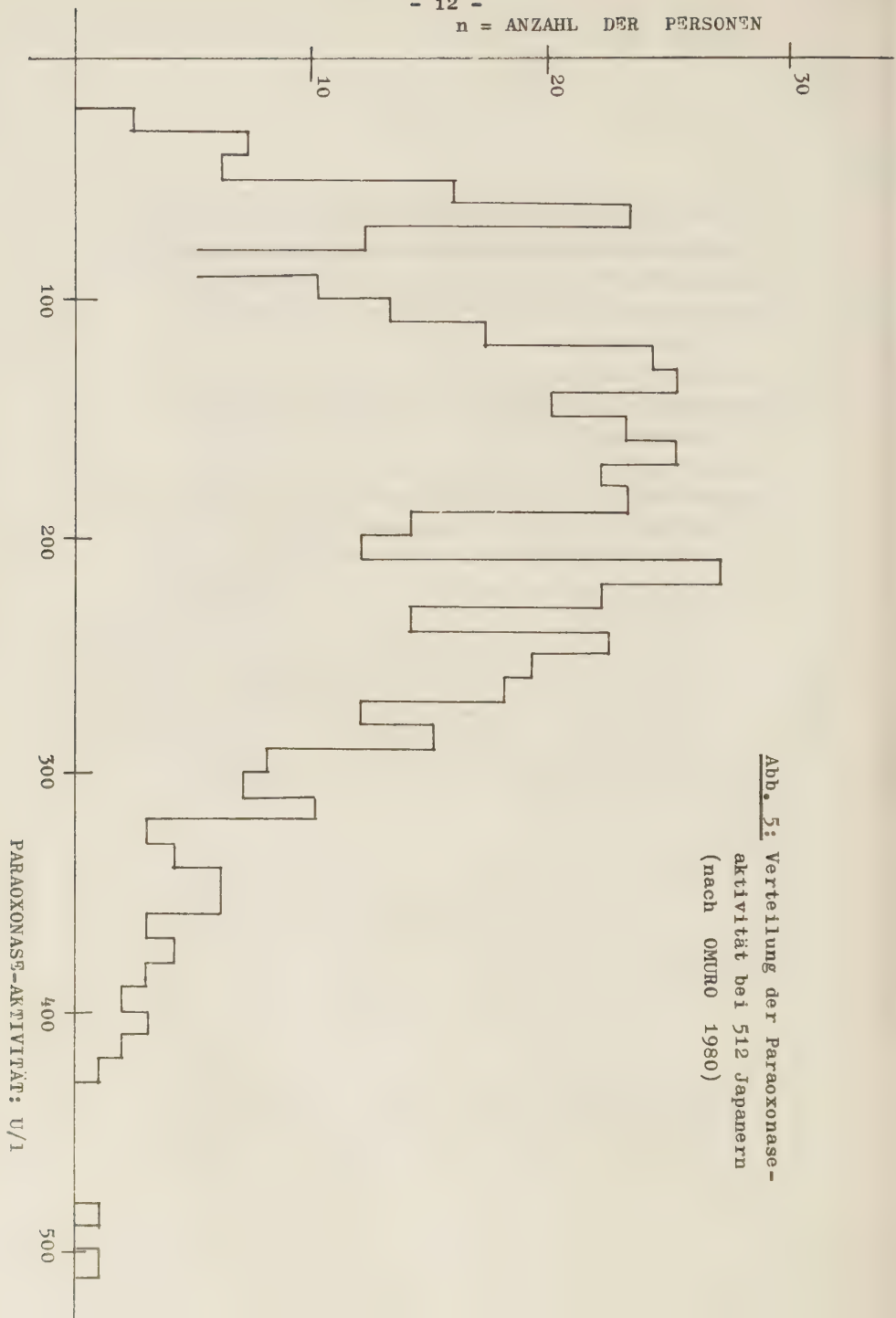


Abb. 5: Verteilung der Paraoxonase-
aktivität bei 512 Japanern
(nach OMURO 1980)

II. PROBLEMSTELLUNG

Die interethnischen Unterschiede in der Verteilung der Paraoxonaseaktivität, auf den, wie schon einleitend gesagt, erstmals durch PLAYFER et al. (1976) aufmerksam gemacht wurde, bildete den Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit.

Die spezielle Aufgabe dieser Arbeit sollte es dabei sein, bei Finnen die Aktivität der Serum Paraoxonase zu bestimmen. Das hierbei festgestellte Verteilungsmuster soll in Beziehung zu bisher bei anderen ethnischen Gruppen gefundenen Verteilungen gesetzt werden.

Wegen der vielfachen, auch heute noch bestehenden Unsicherheiten bei der Rassenzuordnung der Finnen, erschien es interessant, inwieweit bei der Verteilung der Paraoxonaseaktivität im Serum von Finnen, Ähnlichkeiten zu bisher gefundenen rassentypischen Verteilungen bestehen.

Eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit war es, eine eventuelle Altersabhängigkeit der Paraoxonaseaktivität zu prüfen. PLAYFER (1976) hatte zwischen diesen beiden Merkmalen keinen Zusammenhang feststellen können. OMURO (1980) bestätigte die damaligen Ergebnisse für ein japanisches Kollektiv.

PLAYFER (1976) hat sich auch mit der Abhängigkeit der Paraoxonaseaktivität vom Geschlecht befaßt und herausgefunden, daß keine statistisch signifikante Beziehung zwischen den beiden Variablen besteht.

Ob der gleiche Sachverhalt auch für Finnen zutrifft, sollte ebenfalls eine Fragestellung der vorliegenden Untersuchung sein.

LINDORF (1971) prüfte mit der Anti-Che-Methode inwiefern Aufbewahrungszeit und Lagerungstemperatur Unterschiede in der Restaktivität der Serumcholinesterase nach Inkubation in vitro mit E 600 bedingen. Er untersuchte die Cholinesterase-Restaktivitäten von jeweils 5 Seren der niedrigen, mittleren und hohen Gruppe, welche 6 Monate lang bei einer Temperatur von -22°C gelagert wurden. Mit dieser Methode ließ sich eine Aussage über die Stabilität der Paraoxonase machen. Diese Längsschnittuntersuchung zeigte, daß die Aktivitäten der mittleren und höheren Gruppe nach 3 Monaten zwar teilweise abgefallen waren, sich jedoch ihre Gruppenzugehörigkeit nicht verändert hatte. Nach 6 Monaten wiesen die Aktivitäten einiger Seren der mittleren und hohen Gruppe noch nahezu gleiche Höhe wie zu Beginn auf, andere Seren hatten allerdings so sehr an Aktivität verloren, daß sie nicht mehr ihrer Gruppe, sondern der nächst niedrigeren Gruppe zugeordnet waren. Die niedrige Gruppe konnte aus methodischen Gründen nicht beurteilt werden.

In der vorliegenden Arbeit gelangten zwei verschiedenartige Kollektive zur Untersuchung. Ein Kollektiv von finnischen Seren wurde frisch abgenommen und nach ca. 6 Wochen verarbeitet. Aufgrund der vorausgegangenen Feststellungen ließ diese Kollektiv keinen veränderten Verteilungsmodus, im Ver-

gleich zur Verteilung der in vivo-Aktivitäten, erwarten. Die Seren eines zweiten Kollektivs waren bis zur Verwertung etwa 20 Monate bei - 22° C gelagert worden. Der Vergleich beider Kollektive sollte den Einfluß von längerfristiger Lagerung auf den Verteilungsmodus der Serum Paraoxonaseaktivität klären.

III. RASSISCHE EINORDNUNG DER FINNEN

Mit den Mitteln der Archeologie und der Sprachwissenschaft ließ sich die Abstammung der heutigen finnischen Bevölkerung bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht sicher bestimmen. Die ältesten Anzeichen menschlicher Kultur auf finnischem Gebiet stammen aus der Zeit zwischen 8.000 und 7.000 v.Chr. Geburt. Von dieser, nach heutigem Wissen, ältesten Bevölkerung Finnlands, nimmt man an, daß sie auf dem Landwege aus Osteuropa gekommen ist. Nach einer anderen Auffassung wäre sie aus dem asiatischen Raum eingewandert. Von Funden aus der sogenannten Kammkeramik-epoche, um 3.000 v.Chr., ist bekannt, daß die Finnen von damals hauptsächlich einer langschädelligen Rasse von kleinem Wuchs angehörten, der einige kurzschädelige, "mongolide" Elemente angehörten. In der Zeit der sogenannten Bootaxtkultur (um 1.800 bis 1.600 v. Chr.) lebten im südwestlichen Finnland Menschen vom "europiden" Typus, während in Ostfinnland die Urbevölkerung angesiedelt war. In den folgenden 400 Jahren verschmolzen diese beiden Kulturen zur sogenannten

Kiukainen Kultur. Es waren somit zum Zeitpunkt als die eigentlichen Finnen einwanderten, vermutlich im 2. vorchristlichen Jahrtausend, bereits europide und mongolide Rassenelemente vorhanden. Die Identität jener finnischen Einwanderer versuchte man lange Zeit mit den Mitteln der Sprachwissenschaft zu deuten.

Während die finnische Kultur eindeutig europäische Ausprägung besitzt, zeigt die finnische Sprache keine Verwandtschaft zur indogermanischen Sprachenfamilie. Der finnisch-ugrischen Sprachengruppen gehören Finnen, Esten und Ungarn an. Sie ist verwandt mit der in Nordrußland sowohl im europäischen als auch im asiatischen Teil gesprochenen kleinen samojedischen Sprachengruppe und bildet mit dieser die uralische Sprachengruppe. Weitere Sprachverwandtschaften ließen sich nicht mit Sicherheit nachweisen. Die Sprachwissenschaft nimmt u.a. deshalb an, daß die Finnen zusammen mit den Esten und den Ungarn vor mehreren Jahrtausenden ein gemeinsames Volk bildete, welches in Mittelrußland, in der Gegend der mittleren Wolga, beheimatet gewesen sein soll.

In der nachchristlichen Zeit waren es insbesondere schwedische Elemente, welche Eingang in die finnische Bevölkerung fanden (JUTIKKALA, E, 1976).

IV. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Probanden

Eingang in die Arbeit fanden insgesamt zwei Kollektive verschiedener Art.

Ein Kollektiv umfaßte insgesamt 99 klinisch gesunde Personen, davon 67 Frauen und 32 Männer. Die Altersverteilung lag zwischen 18 und 57 Jahren, mit Bevorzugung jüngerer Jahrgänge. Die genannten Personen waren am anatomischen oder physiologischen Institut in Oulu/Finnland tätig. Oulu ist eine am Bottnischen Meerbusen gelegene Hafenstadt.

Verwandtschaft zwischen den einzelnen Personen bestand nicht.

Ein weiteres Kollektiv bestand aus 54 Seren von nicht verwandten und gesunden (Blutspender) finnischen Personen, Einwohner der Orte Rantsila, Ruuki und Haukipudas, welche im Umkreis von Oulu liegen. Die Besonderheit dieser Seren bestand in ihrer tiefgeköhlten Lagerung über insgesamt ca. 20 Monate.

Eine geographische Karte von Finnland zeigt die Ursprungsorte der Probandenseren (Abb. 6).

2. Gewinnung, Aufbewahrung und Transport der Serumproben

Nach Abnahme venösen Blutes von den genannten 99 Personen wurde der Eintritt der Gerinnung abgewartet und durch 15 Minuten dauerndes Zentrifugieren das Serum abgetrennt. Die Serumproben beider Kollektive waren beim anschließenden Transport zum Bestimmungsort Erlangen stets in einem eigeckühlten Behäl-

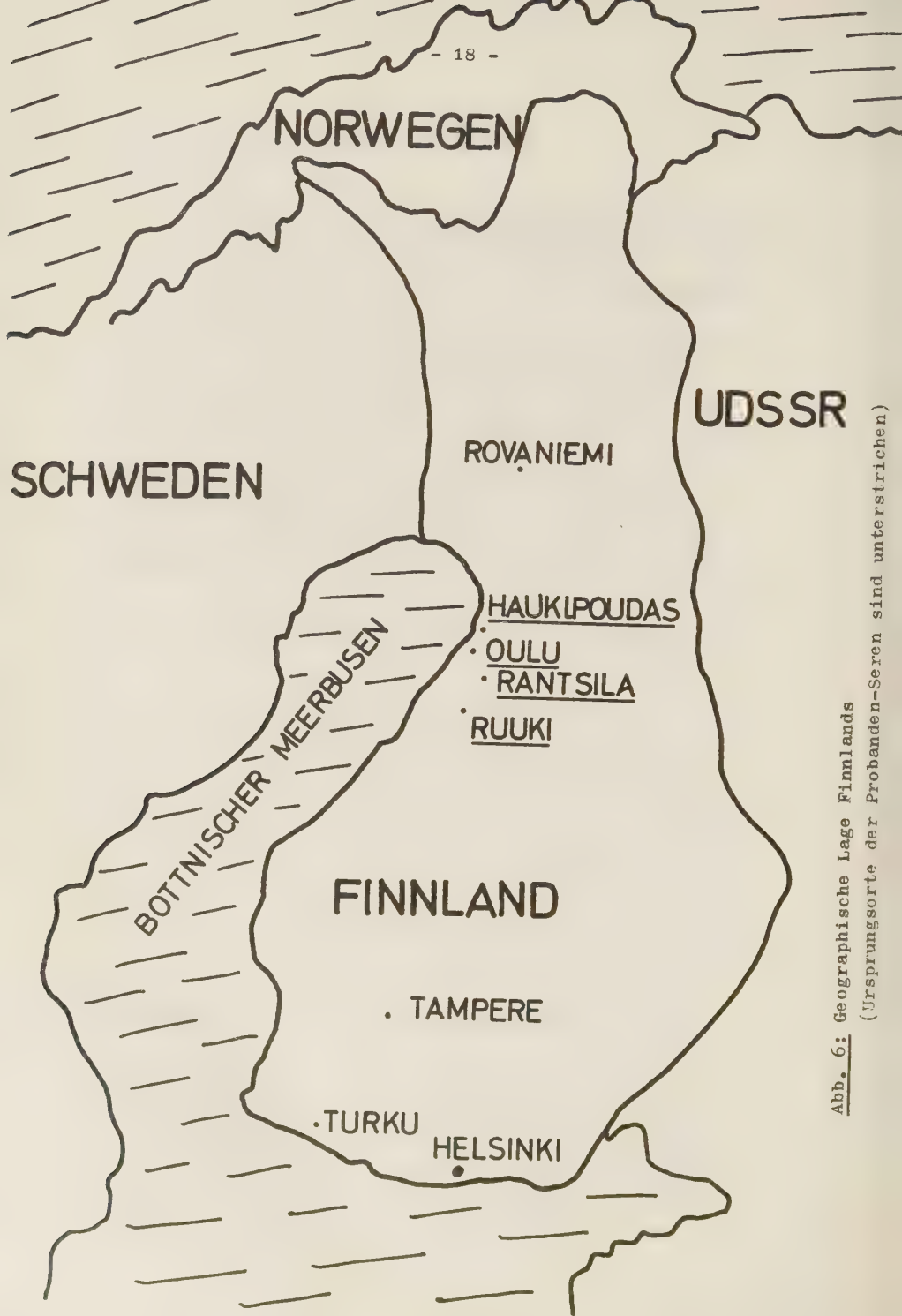


Abb. 6: Geographische Lage Finnlands
(Ursprungsorte der Probanden-Serien sind unterstrichen)

ter aufbewahrt, der ein Erwärmen über 4° C nicht zuließ. Nach folgender Tiefkühlagerung bei - 22° C wurden die Seren nach ca. 6 Wochen jeweils erst am Versuchstag aufgetaut und sogleich verarbeitet.

3. Messung der Aktivität

Die Messung der Paraoxonaseaktivität erfolgte direkt, nach der Methode von KRISCH (1968).

Der Methode liegt die hydrolytische Spaltung von Paraoxon zu p-Nitrophenol durch Serum, welches Paraoxonase enthält, zugrunde (Abb. 7).

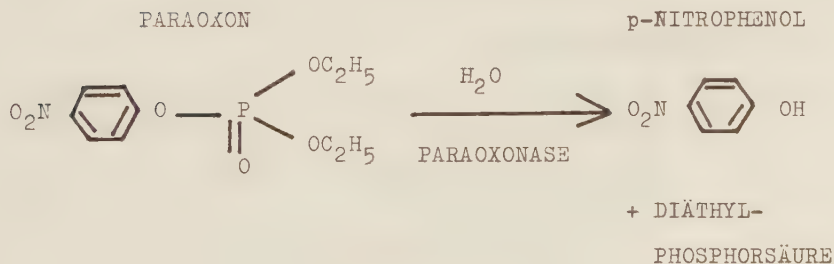


Abb. 7: Enzymatische Spaltung von Paraoxon

Die Aktivität des Enzyms wurde für alle Seren auf folgende Weise ermittelt:

Lösungen

0,1 m Glycin-Natronlauge-Puffer (pH 11,2)

7.507 g Glycin abwiegen, etwa 900 ml. dest. Wasser zugeben.

Sodann mit dem Magnetrührer rühren, bis alles gelöst ist.

Unter ständigem Rühren einige Tropfen 35 %ige Natronlauge zugeben, bis - mit dem pH-Meter - geprüft - ein pH-Wert von 11,2 eingestellt ist.

Dann die Lösung mit dest. Wasser auf 1.000 ml auffüllen.

Trispuffer (pH 8,0)

12,114 g TRIS (Tris-hydroxymethyl-amino-methan) abwiegen, etwa 900 ml dest. Wasser zugeben.

So lange mit dem Magnetrührer rühren, bis alles TRIS gelöst ist.

Unter ständigem Rühren einige Tropfen 37 %ige HCL zugeben, bis - mit dem pH-Meter geprüft - ein pH-Wert von 8,0 eingestellt ist.

Dann wird die Lösung mit dest. Wasser auf 1.000 ml aufgefüllt.

E 600 Stammlösung

($1,2 \cdot 10^{-2}$ m in 0,1 Trispuffer pH 8,0)

0,26 ml E 600 (Paraoxon) in 100 ml Trispuffer (pH 8,0) geben, etwa 10 Minuten lang durch mechanisches Schütteln mischen.

E 600 Gebrauchslösung

Die E 600 Stammlösung wird zum Gebrauch jeweils 1 : 5 mit dest. Wasser verdünnt.

z.B. 10 ml E 600 Stammlösung + 40 ml dest. Wasser

Serum Verdünnung

Für die Bestimmung wurde das Serum 1 : 5 mit 0,9 %iger Kochsalzlösung verdünnt.

z.B. 1 ml Serum + 4 ml 0,9 %ige Kochsalzlösung.

Ansatz

In ein Reagenzglas werden pipettiert:

3,3 ml Glycin-Natronlauge-Puffer (pH 11,2)

0,5 ml Serumverdünnung (1 : 5)

1,0 ml E 600 Gebrauchslösung

Diese Lösungen waren zuvor einzeln mindestens 10 Minuten lang im Wasserbad bei 25° C inkubiert.

Nach Durchmischen der drei Lösungen im Reagenzglas wird ein Teil davon in eine Küvette der Schichtdicke 1 cm eingegossen.

Messung

Nachdem die Küvette sofort ins Photometer eingebracht wurde, wird im Abstand von 30 Sekunden und 180 Sekunden nach dem Zusammengeben der Lösungen zum Meßansatz die Extinktion bei 405 nm abgelesen.

Ausgewertet wird die Extinktionsdifferenz 180 s minus 30 s.

Berechnung

Zum Umrechnung der Extinktionsdifferenzen in nMol wird der molare Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol (in Glycin-NaOH-Puffer pH 11,2) bei 405 nm = $18,05 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \cdot \text{Mol}^{-1}$ zugrunde gelegt.

10 nMol p-Nitrophenol gelöst in 1 ml hätten danach bei $d = 1 \text{ cm}$ und $\lambda = 405 \text{ nm}$ eine Extinktion von 0,1805.

Unter weiterer Berücksichtigung der Serumverdünnung (Umrechnung auf ml Serum durch Multiplikation mit 10), der Meßzeit (Umrechnung auf 1 Min. durch Division durch 2,5) und des Ansatzvolumens (4,8 ml, Multiplikation mit 4,8) errechnet sich die Aktivität nach folgender Formel:

$$\begin{aligned}\text{Aktivität} &= \frac{E \cdot 10 \cdot 4,8 \cdot 10}{0,1805 \cdot 2,5} \\ &= E \cdot 1063 \text{ U/l}\end{aligned}$$

4. Ergebnisse

Die folgende Tabelle 1 enthält die nach der Methode von KRISCH (1968) gemessenen Aktivitäten für die frisch abgenommenen Seren. Tabelle 2 enthält die Werte der 54 älteren Seren. Alter und Geschlecht sind jeweils vermerkt.

Tabelle 1

Aktivitäten der Serum Paraoxonase bei 99 Finnen

Nr.	Alter	Geschlecht	
		männl. = Y	Aktivität
		weibl. = X	U/l
1	36	Y	291
2	29	Y	86
3	23	Y	99
4	24	Y	96
5	49	X	81
6	54	X	218
7	39	X	144
8	23	Y	267
9	24	Y	198
10	25	X	158
11	55	Y	189
12	52	X	85
13	28	X	265
14	28	Y	86
15	26	Y	91
16	44	X	77
17	27	Y	85
18	23	Y	85
19	31	X	175
20	29	X	76
21	21	X	277
22	25	X	294
23	32	Y	254
24	37	X	185
25	33	Y	166

Nr.	Alter	Geschlecht	Aktivität
			U/l
26	43	X	59
27	27	Y	78
28	28	Y	81
29	47	Y	217
30	33	X	444
31	28	X	364
32	33	X	255
33	29	X	247
34	24	X	67
35	31	X	78
36	25	X	79
37	26	X	379
38	57	X	74
39	23	Y	98
40	43	Y	267
41	47	X	232
42	21	X	85
43	43	X	246
44	21	X	91
45	33	X	72
46	36	X	239
47	23	X	232
48	26	Y	83
49	31	Y	169
50	44	X	191
51	34	X	85
52	49	X	216
53	46	X	202

Nr.	Alter	Geschlecht	Aktivität
			U/l
54	29	X	236
55	34	X	162
56	21	X	227
57	29	X	241
58	33	X	36
59	25	X	64
60	28	X	91
61	28	X	79
62	53	X	427
63	52	X	79
64	29	Y	78
65	30	Y	70
66	38	X	80
67	51	Y	251
68	25	X	77
69	43	Y	256
70	32	X	266
71	26	X	169
72	35	Y	249
73	31	X	224
74	27	X	254
75	25	X	413
76	27	X	67
77	25	Y	221
78	37	X	215
79	20	X	186
80	37	X	217
81	22	Y	79

Nr.	Alter	Geschlecht	Aktivität
			U/1
82	18	Y	109
83	28	X	91
84	20	X	293
85	36	Y	18
86	29	X	131
87	45	Y	204
88	32	X	267
89	31	Y	83
90	28	X	81
91	39	X	376
92	44	X	187
93	36	X	78
94	22	Y	178
95	54	X	238
96	40	X	241
97	49	X	80
98	24	X	92
99	42	X	356

Tabelle 2

Aktivitäten der Serum Paraoxonase bei 54 Finnen

(Seren ca. 20 Monate alt)

Nr.	Alter	Geschlecht	Aktivität U/l
		männl. = Y weibl. = X	
1	36	Y	219
2	48	Y	62
3	56	X	166
4	44	X	58
5	36	Y	257
6	51	Y	74
7	44	Y	189
8	50	X	142
9	34	Y	122
10	44	X	66
11	49	X	39
12	38	Y	65
13	42	Y	191
14	44	Y	48
15	30	X	121
16	32	X	128
17	36	Y	67
18	37	Y	63
19	24	Y	167
20	26	Y	226
21	52	Y	153
22	34	Y	208
23	32	X	124
24	26	X	59
25	26	X	59

Nr.	Alter	Geschlecht	Aktivität U/1
26	39	X	44
27	42	X	89
28	31	X	92
29	29	Y	46
30	20	X	61
31	28	Y	47
32	22	X	51
33	32	Y	90
34	30	Y	117
35	38	Y	80
36	23	Y	34
37	34	Y	98
38	26	X	49
39	37	X	79
40	55	X	51
41	20	X	68
42	44	Y	159
43	52	X	97
44	27	Y	99
45	25	X	63
46	44	Y	33
47	34	Y	147
48	37	Y	41
49	22	X	101
50	21	Y	44
51	26	X	52
52	27	Y	137
53	55	X	62
54	34	X	191

V. STATISTISCHE AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Die statistische Auswertung bezieht sich auf die durch Computer (Programmiersystem FORTRAN) ermittelten Aktivitätsverteilungen der Paraoxonaseaktivitäten bei Finnen. Abb. 8 und 9 stellen diese Verteilung dar.

1. Das Kollektiv der frisch abgenommenen Seren

Das Kollektiv der frisch abgenommenen Seren umfaßte 99 Probanden, davon 67 Frauen und 32 Männer. Die Altersverteilung des gesamten Kollektivs lag zwischen 18 und 57 Jahren. Der Mittelwert, welcher bei 33 Jahren lag, zeigt die Bevorzugung jüngerer bis mittlerer Jahrgänge.

Die Gesamtheit der Aktivitäten läßt nach ihrem Verteilungsmuster eine Gruppierung in höhere, mittlere und niedrigere Werte erkennen. Nur 7 % der Probandenserum erreichten eine Paraoxonaseaktivität von mehr als 340 U/l. Aktivitäten zwischen 120 und 340 U/l fanden sich bei 50 % der Probanden. Werte unter 120 U/l wiesen 43 % der Seren auf.

Eine Korrelation zwischen Aktivität und Alter konnte bei einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,1308$ nicht nachgewiesen werden.

Bei der getrennten Betrachtung des weiblichen Kollektivs zeigten sich gleichfalls drei Aktivitätsgruppen, bestehend aus höheren, mittleren

und niedrigeren Aktivitäten. Alter und Aktivität waren bei $r = 0,0212$ nicht korreliert.

Die Verteilung der Paraoxonase Aktivitäten beim männlichen Kollektiv ergab wiederum eine niedrige und mittlere Gruppe von Werten, jedoch fehlten im Vergleich zum Gesamtkollektiv die höheren Werte (Aktivität > 340 U/l) völlig. Eine statistisch signifikante Aussage über einen eventuell unterschiedlichen Verteilungsmodus der Paraoxonaseaktivität bei Männern und Frauen läßt dieses Ergebnis allerdings nicht zu. Hierfür wäre der Stichprobenumfang, bei einem ohnehin seltenen Auftreten hoher Paraoxonase Aktivitäten, zu gering.

Bei der Prüfung einer Altersabhängigkeit der Paraoxonaseaktivität bei Männern fand sich ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,5003$. Somit mußte die Nullhypothese (keine Korrelation zwischen Aktivität und Alter) mit einem Signifikanzniveau von $2 = 1\%$ abgelehnt werden. In Anbetracht der geringen Anzahl von Probanden und der nur sehr schwachen Korrelation kann das Ergebnis jedoch nicht sicher für eine Altersabhängigkeit der Paraoxonaseaktivität bei Männern sprechen.

Weiterhin wurde untersucht, ob die phänotypische Ausprägung der Paraoxonaseaktivität einer geschlechtsspezifischen Abhängigkeit unterliegt. Unter Verwendung des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests zum Vergleich unverbundener Stichproben konnte anhand der ermittelten Testgrößen eine solche Abhängigkeit verneint

werden. Die korrigierte Testgröße betrug für das frisch abgenommene Kollektiv - 0,80815. Der Absolutwert der Testgröße als Bedingung für eine Korrelation bei einem Signifikanzniveau von $2 \leq 5\%$ lag bei 1,96. Durch den gleichen Test wurde auch eine geschlechtsspezifische Altersverteilung ausgeschlossen.

2. Das Kollektiv der 20 Monate alten Seren

Diese Kollektiv umfaßte insgesamt 54 Serumproben. Das Alter der Probanden lag zwischen 20 und 56 Jahren. Die Seren stammten von 25 Frauen und 29 Männern.

Die Verteilung der Paraoxonaseaktivitäten zeigt beim vorliegenden Kollektiv keine Trimodalität, wie sie die Verteilung des vorhergehenden Kollektivs aufwies. Aktivitäten über 340 U/l fehlen gänzlich. 67 % der Probanden hatten eine geringere Aktivität als 120 U/l. Nur 33 % der Aktivitäten lagen über diesem Wert.

Eine Korrelation zwischen Alter und Aktivität für das Gesamtkollektiv muß bei einem Korrelationskoeffizienten von $r = -0,1982$ verneint werden. Ebenso war bei Frauen ($r = -0,2739$) und Männern ($r = -0,0915$), jeweils getrennt betrachtet, kein Zusammenhang zwischen Alter und Paraoxonaseaktivität zu beobachten. Diese Aussagen haben Gültigkeit nur für einen Personenkreis bis zum Alter von etwa 55 Jahren, nachdem die Anzahl älterer Probanden in beiden Kollektiven nur sehr gering war.

Eine Geschlechtsabhängigkeit der Paraoxonaseaktivitäten wurde wiederum durch den Wilcoxon-Test ausgeschlossen.

Über die Verteilungsmerkmale für die Paraoxonaseaktivitäten gibt Tabelle 3 Auskunft.

Tabelle 3: Verteilungsmerkmale der Paraoxonaseaktivität in finnischen Seren

	Paraoxonaseaktivität U/l					Durchschnitts- alter
	Fallzahl	Mittelwert	Standardabw.	Minimalwert	Maximalwert	
Kollektiv A	99	172 U/l	97	18 U/l	444 U/l	33 Jahre
Frauen	67	183 U/l	104	36 U/l	444 U/l	34 Jahre
Männer	32	148 U/l	78	18 U/l	291 U/l	31 Jahre
Kollektiv B	54	100 U/l	57	33 U/l	257 U/l	35 Jahre
Frauen	25	84 U/l	40	39 U/l	191 U/l	36 Jahre
Männer	29	113 U/l	66	33 U/l	257 U/l	35 Jahre

Kollektiv A = frisch abgenommene Seren; Kollektiv B = ca. 20 Monate alte Seren.

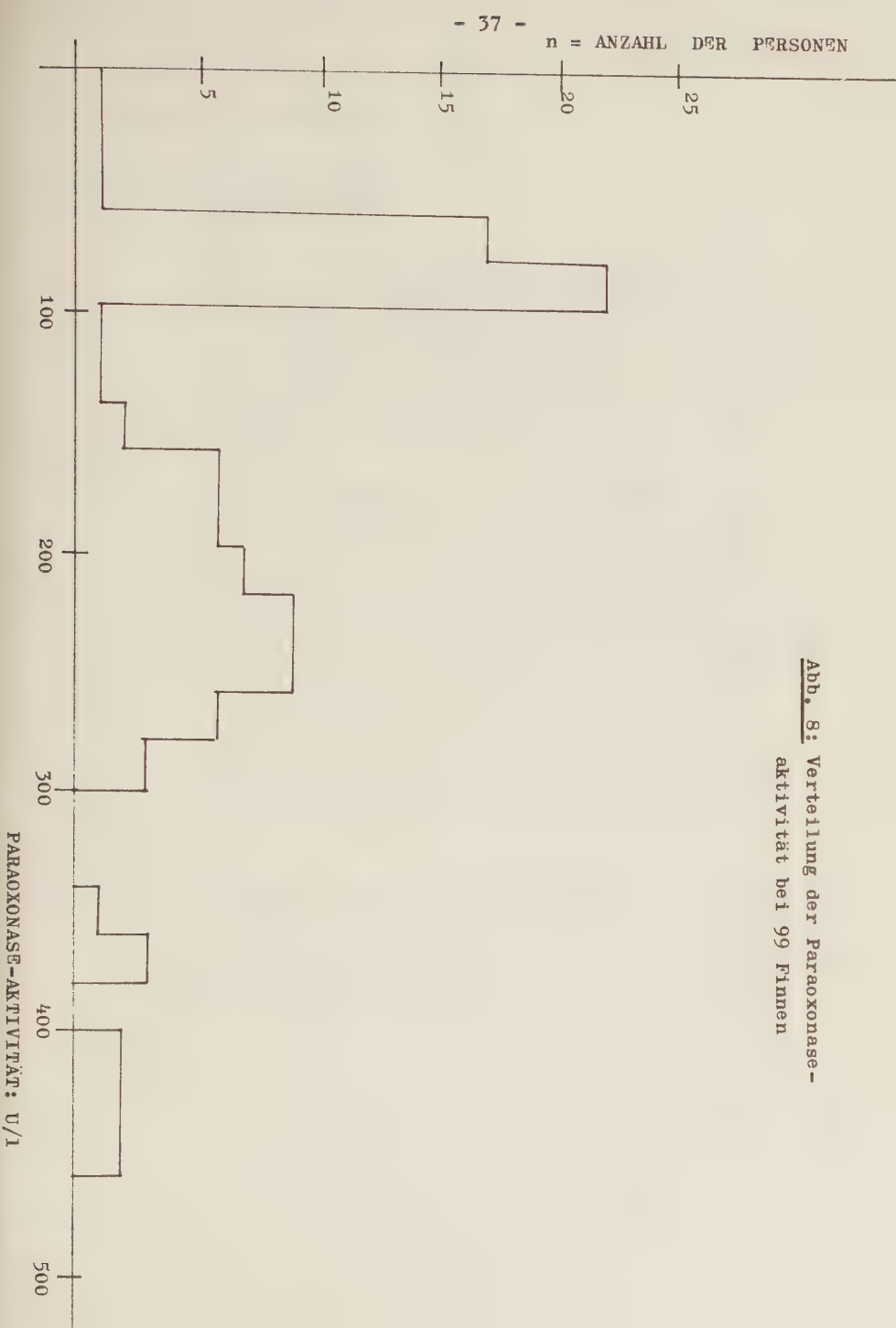
VI. DISKUSSION

Abbildung 8 zeigt die Aktivitätsverteilung der Serumpaeraxonase für 99 frisch abgenommene und nach ca. 6 Wochen verarbeitete finnische Seren. Hier liegt rein optisch eine Paraoxonase-Verteilung vor, die der Verteilung bei 180 Westdeutschen in etwa entspricht, wie sie von GELDMACHER v. - MALLINCKRODT et al. (1973)

Bei beiden Verteilungen besteht eine dreigipflige Kurve, was für ein Vorliegen von drei Phänotypen der Paraoxonaseaktivität auch bei Finnen spricht. Die Maxima beider Verteilungen liegen für niedrige Aktivitäten jeweils bei etwa 80 U/l, die der mittleren Aktivitäten bei jeweils etwa 240 U/l. Ein deutlicher Einschnitt zeigt sich in der finnischen Verteilung bei 120 U/l, d.h., daß sich die drei Phänotypen noch etwas deutlicher als in der deutschen Verteilung gegeneinander absetzen. Die erreichten Maximalwerte liegen beim finnischen Kollektiv mit 460 U/l um ca. 40 U/l niedriger als bei dem deutschen. Dabei könnte es sich allerdings um den Fehler der kleineren Zahl handeln. Zieht man in Betracht, daß die finnische Verteilung der Paraoxonase-Aktivitäten der deutschen Verteilung stark ähnelt, während sie anderen Verteilungen, wie etwa der japanischen, nicht nahe steht, so läßt sich für finnische Paraoxonaseaktivitäten ein Erbgang, wie er für deutsche Aktivitäten gefordert wird, vermuten. Um dies zu sichern sind Familienuntersuchungen bei Finnen nötig.

Abbildung 9 zeigt die Verteilung der Paraoxonase-Aktivität bei 54 finnischen Seren, die vor ihrer Verwendung während ca. 20 Monaten tiefgekühlt gelagert worden waren. Hier wurden insgesamt wesentlich niedrigere Aktivitäten gefunden als bei den frisch abgenommenen Seren. Aktivitäten über 260 U/l fehlten im Gegensatz zum zuvor besprochenen Kollektiv völlig. Ebenso erscheint die Verteilung nach links, zu geringeren Aktivitäten hin verschoben. Ein Maximum für mittlere Werte bei 240 U/l deutet sich nicht einmal an. Liegt der niedrige Phänotyp bei den kurzzeitig gelagerten Seren größtenteils zwischen 60 und 100 U/l, so liegt er hier im Bereich zwischen 40 und 80 U/l. Es dürfte also, im Vergleich zu den erwarteten Ausgangsaktivitäten, ein Aktivitätsschwund während 20 Monaten stattgefunden haben. Da mittlere und hohe Aktivitäten im Kurvenbild nicht mehr identifizierbar sind, liegt die Vermutung nahe, daß sie einen stärkeren Befall als niedrige Aktivitäten erleiden und eventuell in diese einmünden. Dieses Untersuchungsergebnis stimmt mit den Erkenntnissen von LINDORF (1971) überein. Lindorf zeigte, daß eine Stabilität der Paraoxonase-Aktivität bereits nach 6 Monaten bei -20°C nicht mehr erwartet werden kann.

Abb. 8: Verteilung der Paraoxonase-
aktivität bei 99 Finnen



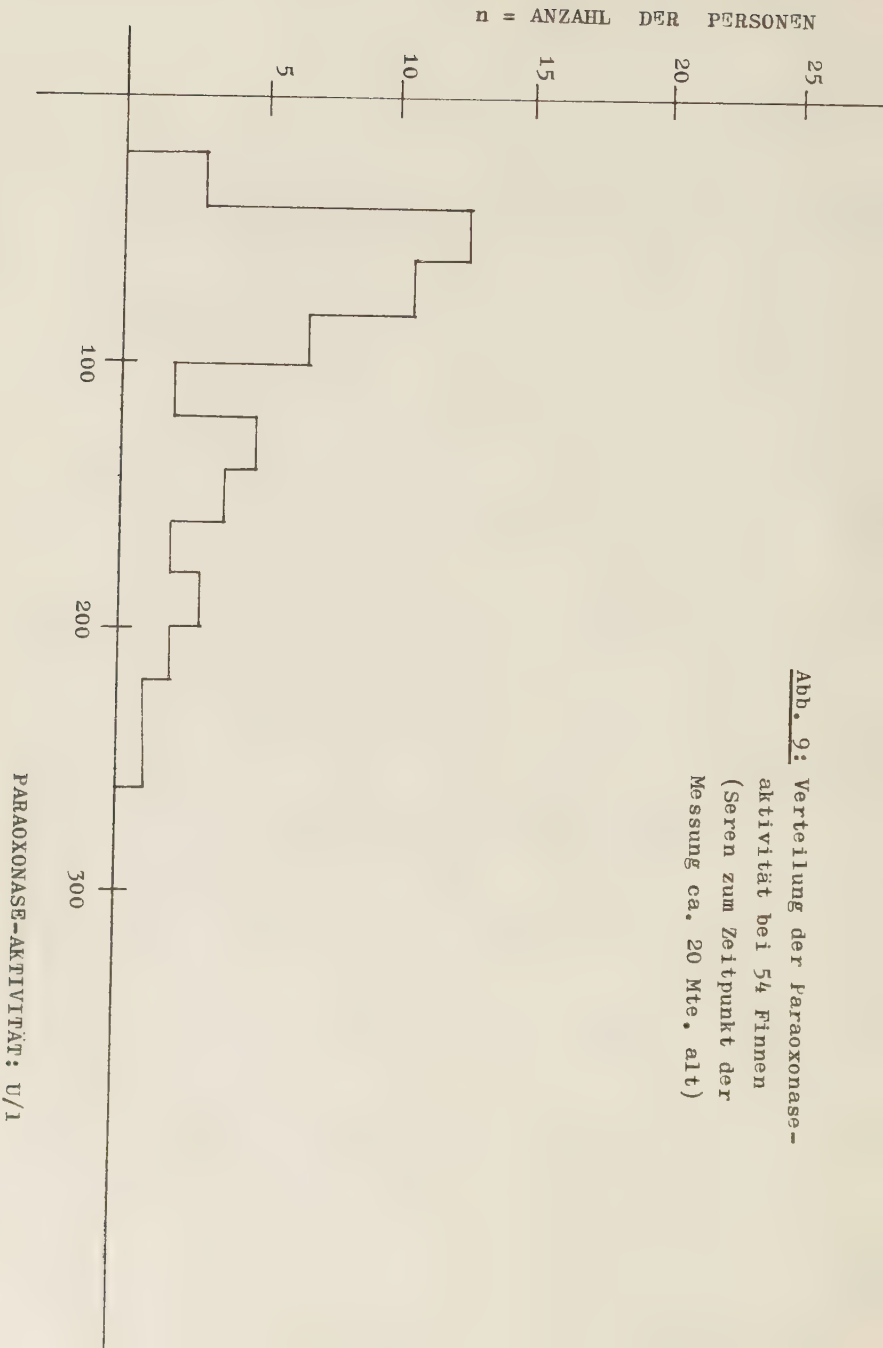


Abb. 9: Verteilung der Paraoxonase-
aktivität bei 54 Finnen
(Seren zum Zeitpunkt der
Messung ca. 20 Mte. alt)

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Bisherige Untersuchungen an verschiedenen Populationen weisen darauf hin, daß das Verteilungsmuster der Serumpaaronaseaktivität genetisch determiniert ist. Es fanden sich Aktivitätsmuster, die es erlauben, von einer europäischen, asiatischen bzw. afrikanischen Verteilung zu sprechen.

Vorliegende Untersuchung ergab für Finnen eine trimodale Paraoxonaseaktivitäts-Verteilung, bestehend aus hohen, mittleren und niedrigen Aktivitäten, wie sie beim europäischen Verteilungstyp, etwa bei Deutschen, vorliegt. Diese Aussage trifft jedoch nur für Seren zu, die nach der Blutabnahme relativ bald untersucht werden. Jene Seren, welche über ca. 20 Monate vor ihrer Messung bei -22°C gelagert worden waren, ließen die typische trimodale Verteilung nicht mehr erkennen. Offensichtlich hatte im genannten Zeitraum ein Aktivitätsabfall bei den einzelnen Seren stattgefunden.

In Übereinstimmung mit vorausgegangenen Untersuchungen bei anderen Populationen konnte diese Studie keinen Zusammenhang zwischen Alter und Geschlecht einerseits und Paraoxonaseaktivität andererseits nachweisen.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

1. ALDRIDGE, W.N.:

Serumesterases. 1. Two types of esterases (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination.

Biochem. J. 53, 110 (1953a)

2. ALDRIDGE, W.N.:

Serumesterases. 2. An enzyme hydrolysing diethyl-p-nitrophenyl phosphate (E 600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera.

Biochem. J. 53, 117 (1953b)

3. ERDÖS, E.G.; BOGGS, L.E.:

Hydrolysis of paraoxon in mammalian blood.
Nature (Lond.) 190, 716 (1961)

4. GELDMACHER - v. MALLINCKRODT, M.; RABAST, U.;
LINDORF, H.H.:

Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serum-Cholinesterasen mit E 600 (0,0-Diäthyl-0-(p-nitrophenyl)-phosphat).

Arch. Toxikol. 25, 223 (1969)

5. GELDMACHER - v. MALLINCKRODT, M.; BAUMGARTNER, W.;
PETENYI, M.; BURGIS, H.; LINDORF, H.H.; METZNER, H.:

Korrelation zwischen der unterschiedlichen Vergiftbarkeit der Serumcholinesterase durch E 600 und der Aktivität des E 600 spaltenden Enzymsystems in menschlichen Seren.

Z. Physiol. Chem. 353, 217 (1972)

6. GELDMACHER - v. MALLINCKRODT, M.; LINDORF, H.H.;
PETENYI, M.; FLÜGEL, M.; FISCHER, Th., HILLER, Th.:
Genetisch determinierter Polymorphismus der
menschlichen Serum Paraoxonase (EC 3.1.1.2.)
Humangenetik 17, 331 (1973)
7. GELDMACHER - v. MALLINCKRODT, M.; HOMMEL, G.;
DUMBACH, J.:
On the genetics of the human serum paraoxonase
(EC 3.1.1.2.)
Human. Genet. 50, 313 (1979)
8. HECHTEL, R.:
Die Hemmung der menschlichen Serum Paraoxonase
durch EDTA.
Dissertation Erlangen 1980
9. JUTIKKALA, E.:
Geschichte Finnlands
Stuttgart 1976
10. KRISCH, K.:
Enzymatische Hydrolyse von Diäthyl-p-nitro-
phenyl-phosphat durch menschliches Serum.
Z. Klin. Chem. Klin. Bioch. 6, 41 (1968)
11. MAIN, A.R.:
The purification of the enzyme hydrolysing
diethyl-p-nitrophenyl-phosphate (paraoxon) in
sheep serum.
Bioch. J. 74, 10 (1960 a)
12. MAIN, A.R.:
The differentiation of the A-type esterases in
sheep serum.
Biochem. J. 75, 188 (1960 b)

13. MOUNTER, L.A.; WHITTAKER, V.P.:
The hydrolysis of esters of phenol by
cholinesterases and other esterases.
Biochem. J. 54, 551 (1953)
14. NEAL, R.A.:
Enzymic mechanism of metabolism of the
phosphorothioate insecticides.
Arch. Intern. Med. 128, 118 (1971)
15. OMURO, O.:
Serum Paraoxonase Polymorphism in Japan.
Dissertation Erlangen 1980
16. PLAYFER, J.R.; EZE, L.C.; BULLEN, M.F.; EVANS, D.A.P.:
Genetic polymorphism and interethnic variability
of plasma paraoxonase activity.
J. Med. Gen. 13, 337 (1976)
17. POORE, R.E.; NEAL, R.A.:
Evidence für extrahepatic metabolism of parathion.
Toxico. Appl. Pharmacol. 23, 759 (1972)
18. ZECH, R.; ZÜRCHER, K.:
Organophosphate splitting serum enzymes in
different mammals.
Comp. Biochem. Physiol. (B) 48, 427 (1974)

LEBENS LAUF

Name	koller, <u>Alfred</u> Peter
Geburtsdatum	24.05.1952
Geburtsort	8430 Neumarkt/Opf.
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Vater	koller, Alois, kaufm. Angestellter
Mutter	Koller, Maria, geb. Stiegler
Schulen	Sept. 1958 - Juli 1964 Grundschule Sept. 1964 - Juli 1968 Staatl. Realschule
Berufstätigkeit	August 1968 - August 1970 Banklehre, erfolgreiche Kaufmannsgehilfenprüfung am 26. Februar 1971
Weiterführende Schule	Sept. 1970 - Juni 1974 Humanistisches Gymnasium in Bamberg
Studium	Mai 1975 - April 1978 Studium der Humanmedizin in Würzburg; Mai 1978 - Mai 1981 Studium der Humanmedizin in Erlangen; Medizinisches Staatsexamen im Mai 1981 Approbation als Arzt im Juni 1981. Sept. 1981 - Januar 1982 Stabsarzt in der Bundeswehr Seit Februar 1982 Assistenzarzt am Pathologischen Institut des Klinikums Nürnberg

Copy - Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131 - 26197